

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02378

研究課題名(和文) Med26による新規転写制御機構と腫瘍性疾患との関わりについての解明

研究課題名(英文) Elucidation of the relation between novel transcription regulation by Med26 and the onset of neoplastic disease

研究代表者

高橋 秀尚 (TAKAHASHI, Hidehisa)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：30423544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質をコードする遺伝子やNon-coding RNA 遺伝子はRNAポリメラーゼII (Pol II) によって転写される。これまでに、われわれはメディエーター転写複合体のサブユニットMed26が、2つの異なる転写伸長因子複合体Super elongation complex (SEC) とLittle elongation complex (LEC) を使い分けることによって、異なる遺伝子のPol IIによる転写を制御することを明らかにした。本研究で、Med26とSECはポリAのあるmRNAの転写を制御する一方で、Med26とLECはポリAの無い遺伝子の転写を制御することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、Med26がSECとLECを使い分けることによって転写開始後のプロセス(転写伸長、転写終結)を制御し、mRNAのポリA付加を決定していることが明らかとなれば、遺伝子発現制御の研究分野においてブレークスルーの1つとなることが期待できる。また、Med26はがんや白血病などの腫瘍性疾患の原因となっていることも予想され、本研究による将来の臨床医学への貢献も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Protein-encoding genes and non-coding RNA genes are transcribed by RNA polymerase II (Pol II). We have found that the human Mediator subunit Med26 uses two different transcription elongation complexes, Super elongation complex (SEC) and Little elongation complex (LEC), to regulate different types of genes by Pol II. In this study, we found that Med26 and SEC regulate the transcription of mRNA with poly A, while Med26 and LEC regulate the transcription of genes without poly A.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子発現制御 転写 RNAポリメラーゼII

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノムワイドな ChIP (クロマチン免疫沈降) -seq や RNA-seq 解析により、非常に多くのヒト遺伝子 (約 30%と予想される) で、転写開始後に RNA ポリメラーゼ II (Pol II) がプロモーター近傍 (転写開始点の 20~50 塩基下流) で一時停止していることが明らかになり、転写開始後の転写伸長や転写終結のプロセスが遺伝子発現の制御に重要な役割を果たしていることがわかってきた。

Pol II の一時停止は、原がん遺伝子 *c-Myc* を始め、迅速あるいは同調した発現誘導が必要な熱ショック遺伝子 *Hsp70*、血清応答性遺伝子や発生制御遺伝子など、非常に多くのヒト遺伝子で見られる。Pol II の一時停止が解除され新生 RNA の合成を再開するためには、P-TEFb や ELL/EAF などの転写伸長因子の働きが必要である。ところが、これらの転写伸長因子がどのようにして特定の遺伝子領域に時期特異的にリクルートされるのかは未知であった (図 1)。

われわれはこれまでに、メディエーター複合体 (Mediator) のサブユニット Med26 が、その N 末端ドメイン (NTD) によって、転写伸長因子複合体 Super elongation complex (SEC) を *c-Myc* や *Hsp70* などの腫瘍関連遺伝子領域にリクルートし、転写伸長を促進することを明らかにした。SEC は転写伸長因子の ELL/EAF、P-TEFb に加え MLL 融合パートナー因子の AF4、AFF4、AF9 や ENL をサブユニットとして有し、小児の難治性リンパ性白血病の混合型急性白血病 (Mixed lineage leukemia) の発症に関与している。

われわれは、Med26 の NTD に結合するもう一つの転写伸長因子複合体 Little elongation complex (LEC) を同定した。LEC は転写伸長因子の ELL/EAF に加え、ICE1、ICE2、ZC3H8 をサブユニットとして有す。興味深いことに、われわれは、Med26 が LEC を *small nuclear RNA (snRNA)* 遺伝子領域にリクルートすることによって、それらの遺伝子の転写伸長を促進することを明らかにした。このように、Med26 は SEC と LEC を使い分けることによって異なる遺伝子の転写を制御することがわかった。

さらに最近、われわれは Med26 が LEC と共に、*snRNA* 遺伝子領域に加えて、複製依存性ヒストン遺伝子領域にも存在することを発見した。*snRNA* 遺伝子やヒストン遺伝子の転写産物 (mRNA) は、通常は、ポリアデニル化 (ポリ A 付加) されない。ところが、興味深いことに、Med26 や LEC の機能を阻害 (ノックダウン) すると、ヒストン遺伝子や *snRNA* 遺伝子の mRNA にポリ A が異常に付加されることがわかった。またこのことから、Med26 と LEC は、ヒストン遺伝子や *snRNA* 遺伝子の転写をポリ A 付加シグナルの前に終結させることにより、mRNA のポリ A 付加を防いでいることがわかった (図 2)。そしてこれらの結果から、Med26 と SEC はポリ A のある遺伝子の転写を制御し、Med26 と LEC はポリ A のない遺伝子 (ヒストン遺伝子や *snRNA* 遺伝子) の転写を制御する可能性が浮かび上がってきた (図 3)。さらに、Med26 の機能を阻害すると、さまざまな細胞の増殖が抑制されることから、Med26 は SEC や LEC を遺伝子領域にリクルートすることによって、細胞の増殖を促進することが考えられる。ヒストン遺伝子の発現上昇もがんの進展に寄与することが示唆されており、Med26 は、SEC を *c-Myc* や *Hsp70* などの腫瘍関連遺伝子領域に、LEC をヒストン遺伝子領域にリクルートすることによって、腫瘍性疾患の発症メカニズムに関与している可能性が考えられる。

図1: 遺伝子発現において転写開始後のプロセス (伸長、終結) が重要である

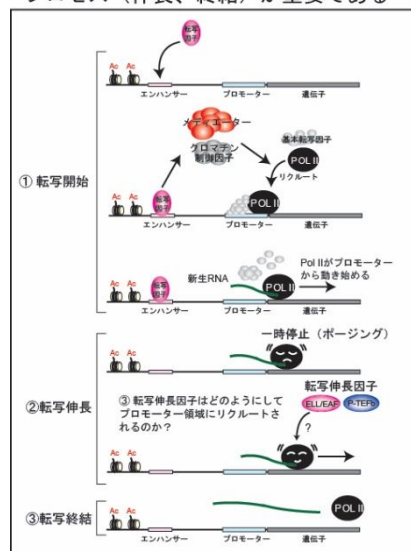


図2: Med26 は LEC と共役し、転写を正常に終結させることによって、Pol II の Read through (読み過ぎ) を抑制し、ポリ A 付加を防ぐ

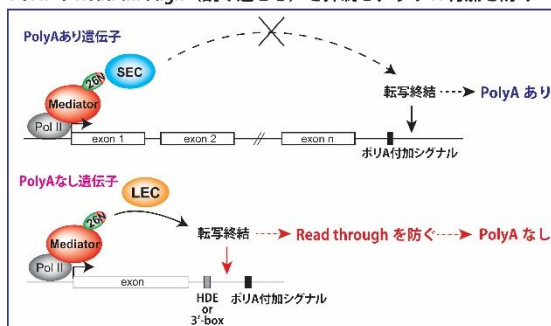
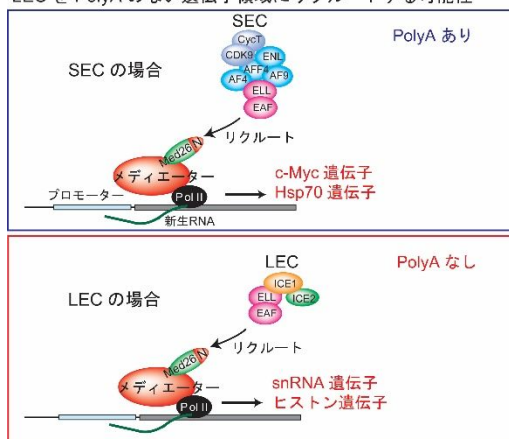


図3: Med26 は SEC を PolyA のある遺伝子領域にリクルートし、LEC を PolyA のない遺伝子領域にリクルートする可能性



2. 研究の目的

これまでの遺伝子発現制御の研究では、転写開始までの過程でプロモーターにリクルートされる Pol II の量が決められ、それが遺伝子発現の強弱を決定するという概念がセントラルドグマであった。そのため、クロマチン制御やエピジェネティクスを含む多くの研究が転写開始までのプロセスに力を注いできた。ところが、多細胞生物において、非常に多くの遺伝子で Pol II が転写開始後に一時停止することから、転写開始後のプロセスの解明は、遺伝子発現制御の研究において非常に重要であることがわかった。本研究では、Med26 が SEC と LEC を使い分けることによって転写開始後のプロセス（転写伸長、転写終結）を制御し、mRNA のポリ A 付加を決定していることを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(i) SEC がポリ A のある遺伝子の転写を制御し、LEC がポリ A のない遺伝子の転写を制御するのかについて細胞レベルで解明する。

SEC や LEC によって制御される遺伝子を ChIP-seq 解析や RNA-seq 解析を行い網羅的に明らかにする。

Med26 や LEC の機能を阻害する（ノックダウン）によって、転写が正常に終結されず、Pol II による Read through（読み過ぎ）が起こる遺伝子を網羅的に解明する。

(ii) Med26 が LEC と共役し、ポリ A のない遺伝子において、転写伸長から終結までの機能を果たすのかについて細胞レベルで解明する。

プロテオミクス解析を行い、LEC と結合する転写終結因子や RNA プロセシング因子、さらに核外輸送に関わる因子を網羅的に同定する。

(iii) Med26 が、さまざまな組織（血液、肝臓、脳など）においてどのような生理的役割を果たすのかについて解明する。

Med26 のコンディショナルノックアウトマウスを作製し、Med26 の各組織（造血組織や肝臓、脳、腸管）における機能を解明する。

### 4. 研究成果

#### 【MED26 による SEC と LEC の使い分けの機構の解明】

MED26 による SEC と LEC の使い分けの細胞機能における意義を追求すべく、SEC によって制御される遺伝子の網羅的解明を試みた。すると、Med26 と SEC は Pol II がプロモーター近傍で一時停止しているような *c-Myc*, *Snail2*, *Hsp70* などの遺伝子の発現を制御することがわかった。一方で、Med26 と LEC のサブユニット ICE1 をノックダウンした細胞を用いて RNA シークエンス解析を行ったところ、mRNA にポリ A が付加されないような複製依存的ヒストン遺伝子や snRNA 遺伝子において、転写が正常に終結されずに Pol II がポリ A 付加シグナル領域を Read through（読み過ぎ）し、mRNA にポリ A を付加してしまうことが明らかとなった。

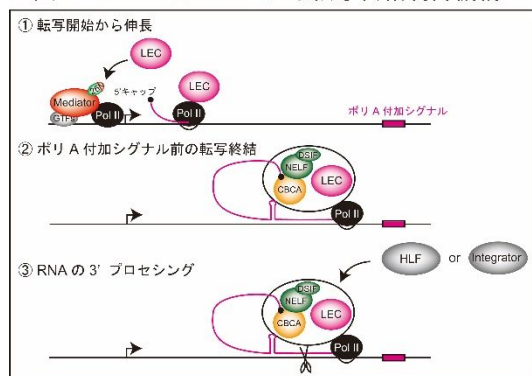
#### 【LEC によるポリ A のない遺伝子の転写制御機構の解明】

われわれは LEC 結合因子のプロテオミクス解析から、LEC には転写終結機能を有する DSIF/NELF/Cap-binding 複合体 (CBCA)、3' 末端プロセシングの機能を有する Integrator 複合体 (snRNA の 3' 末端プロセシング因子) や Heat labile factor 複合体 (HLF: 複製依存性ヒストンの mRNA の 3' 末端プロセシング因子) が結合することを明らかにした。このことから、LEC は snRNA 遺伝子や複製依存性ヒストン遺伝子領域の転写終結点において DSIF/NELF/Cap-binding 複合体をリクルートし、ポリ A 付加シグナルの前に転写伸長を止める。そこでさらに LEC は、Integrator 複合体や HLF 複合体をリクルートすることによって、snRNA やヒストン mRNA の 3' 末端プロセシングをそれぞれ促進することが明らかとなった（図 4 参照）。このように、Med26 は SEC と LEC を使い分けることによって、それぞれ mRNA にポリ A のある遺伝子とポリ A のない遺伝子の発現を制御することが明らかとなった。

#### 【Med26 の組織・個体において果たす役割の解明】

Med26 のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。今後、各種 Cre マウスと交配し、Med26 の組織ごとの役割の解明を目指す。

図4：Med26とLECによる転写終結制御機構



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sasaki K*, Kojitani N, Hirose H, Yoshihama Y, Suzuki H, Shimada M, Takayanagi A, Yamashita A, Nakaya M, Hirano H, Takahashi H*, Ohno S*.	4. 巻 31(1)
2. 論文標題 Shank2 binds to aPKC and controls tight junction formation with Rap1 signaling during establishment of epithelial cell polarity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.02.088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi H*, Ranjan A, Chen S, Suzuki H, Shibata M, Hirose T, Hirose H, Sasaki K, Abe R, Takigawa I, Tsukiyama T, Watanabe M, Fujii S, Iida M, Yamamoto J, Yamaguchi Y, Suzuki Y, Matsumoto M, Nakayama I. K, Washburn P. M, Saraf A, Florens L, Sato S, Tomomori-Sato C, Conaway C.R, Conaway W.J*, Hatakeyama S*	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 The role of Mediator and Little Elongation Complex in transcription termination.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14849-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Miyake N*, Takahashi H, Nakamura K, Isidor B, Hiraki Y, Koshimizu E, Shiina M, Sasaki K, Suzuki H, Abe R, Kimura Y, Akiyama T, Tomizawa SI, Hirose T, Hamanaka K, Miyatake S, Mitsuhashi S, Mizuguchi T, Takata A, Obo K, Kato M, Ogata K, Matsumoto N*.	4. 巻 106(1)
2. 論文標題 Gain-of-Function MN1 Truncation Variants Cause a Recognizable Syndrome with Craniofacial and Brain Abnormalities.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Hum Genet.	6. 最初と最後の頁 13-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2019.11.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yanagi T, Watanabe M, Hata H, Kitamura S, Imafuku K, Yanagi H, Homma A, Wang L, Takahashi H, Shimizu H, Hatakeyama S.	4. 巻 78(24)
2. 論文標題 Loss of TRIM29 alters keratin distribution to promote cell invasion in squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 6795-6806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-18-1495.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yaguchi H, Yabe I, Takahashi H, Watanabe M, Nomura T, Kano T, Watanabe M, Hatakeyama S.	4. 巻 265(4)
2. 論文標題 Anti-Sez612 antibody detected in a patient with immune-mediated cerebellar ataxia inhibits complex formation of GluR1 and Sez612.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurology	6. 最初と最後の頁 962-965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00415-018-8785-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yabe I, Yaguchi H, Kato Y, Miki Y, Takahashi H, Tanikawa S, Shirai S, Takahashi I, Kimura M, Hama Y, Matsushima M, Fujioka S, Kano T, Watanabe M, Nakagawa S, Kunieda Y, Ikeda Y, Hasegawa M, Nishihara H, Ohtsuka T, Tanaka S, Tsuboi Y, Hatakeyama S, Wakabayashi K, Sasaki H.	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Mutations in bassoon in individuals with familial and sporadic progressive supranuclear palsy-like syndrome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-19198-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto J, Takada S, Kinugawa S, Furihata T, Nambu H, Kakutani N, Tsuda M, Fukushima A, Yokota T, Tanaka S, Takahashi H, Watanabe M, Hatakeyama S, Matsumoto M, Nakayama KI, Otsuka Y, Sabe H, Tsutsui H, Anzai T.	4. 巻 138(18)
2. 論文標題 Brain-Derived Neurotrophic Factor Improves Limited Exercise Capacity in Mice With Heart Failure.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 2064-2066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035212.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高橋 秀尚, Amol Ranjan, 鈴木 秀文, 阿部 竜太, 廣瀬 智威, 佐々木 和教, 山口 雄輝, 中山 敬一, Joan Conaway, Ronald Conaway, 畠山 鎮次
2. 発表標題 メディアーター複合体による転写終結制御機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 秀文, 阿部 竜太, 安井 七海, 高橋 秀尚
2. 発表標題 メディエーターは2つの異なる核内凝集体を結びつけることによって転写終結を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶋田 美穂, 中太 智義, 高橋 秀尚, Robert G.Roeder
2. 発表標題 クロマチン構造変換を伴った遺伝子発現制御機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 秀尚
2. 発表標題 メディエーター複合体による転写制御機構の解明
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahashi H, Amol Ranjan, Shiyuan Chen, Shibata M, Takigawa I, Watanabe M, Tsukiyama T, Fujii S, Yamamoto J, Yamaguchi Y, Matsumoto M, Nakayama K, Suzuki Y, Sato C, Sato S, Ronald C. Conaway, Joan W. Conaway, Hatakeyama S:
2. 発表標題 The role of Mediator in transcription termination.
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋 秀尚
2. 発表標題 メディエーター複合体のサブユニットMED26による転写制御機構
3. 学会等名 第12回日本エピジェネティクス研究会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ  
<https://ycu-molecularbiology.jp/>  
 横浜市立大学・大学院医学研究科・分子細胞生物学教室  
<https://ycu-molecularbiology.jp/>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------